

II-527 - REMOÇÃO DO HORMÔNIO 17-ALFA ETINILESTRADIOL (EE2) PELA MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* COM VISTAS AO TRATAMENTO TERCIÁRIO DE ESGOTO

André Luis de Sá Salomão⁽¹⁾

Professor Adjunto do Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente (DESMA) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Vinícius Malta Rabello

Mestrando do Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental (PEAMB) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Gabriele Araújo Correa da Rocha

Mestranda do Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental (PEAMB) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Lia Cardoso Rocha Saraiva Teixeira

Professora Adjunta do Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente (DESMA) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Marcia Marques Gomes

Professora Titular do Departamento de Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente (DESMA) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

Endereço⁽¹⁾: Rua São Francisco Xavier 524, Maracanã, Rio de Janeiro – RJ, CEP: 20550-900, Brasil, Tel: (21) 23340959, e-mail: andre@andresalomao.com

RESUMO

Esgotos domésticos lançados no ambiente representam um dos problemas mais graves e crônicos em termos ambientais e de saúde pública no Brasil. Nas últimas décadas, os micropoluentes, como o 17- α etinilestradiol (EE2), vêm sendo constantemente detectados em concentrações muito baixas nas águas superficiais, pois dentre outras questões, observa-se que as estações de tratamento convencional de esgoto, em sua imensa maioria, não foram concebidas para remoção de micropoluentes. Para o enfrentamento desse problema o tratamento de efluentes por processo de fotorremediação é bastante promissor, por ser uma tecnologia de baixo custo, boa eficácia e simplicidade operacional. No presente trabalho investigou-se o potencial de redução da concentração do hormônio 17- α etinilestradiol (EE2) em meio aquoso pela microalga unicelular *Chlorella vulgaris*. Os resultados obtidos comprovam o papel da microalga na degradação de EE2, tendo em vista a redução de 29,48 μg de EE2 por L após 168 h na presença das microalgas, frente à redução de 11,98 μg de EE2 por L observada no controle (ausência de microalgas) nas mesmas condições. O período entre 0 e 24 h foi o de maior desempenho da microalga frente ao controle, resultando inclusive na redução da atividade estrogênica. Os resultados obtidos corroboram com estudos anteriores e reforçam o potencial das microalgas como agentes eficazes para a remoção de micropoluentes ambientais.

PALAVRAS-CHAVE: Fotorremediação, *Chlorella vulgaris*, 17- α etinilestradiol, Desregulador Endócrino, Tratamento de esgoto.

INTRODUÇÃO

Esgotos domésticos lançados no ambiente representam um dos problemas mais graves e crônicos de saúde humana e ambiental no Brasil. Segundo o Sistema Nacional de Informações sobre o Saneamento (SNIS, 2017), do total de esgoto gerado nos municípios atendidos com abastecimento de água, somente cerca de 43% sofreram algum tipo de tratamento, e cerca de 57% de todo esgoto gerado no Brasil foi lançado in natura em corpos hídricos. Tal cenário é absolutamente incompatível com qualquer planejamento que vise a elevação do nível socioeconômico e sanitário de uma população e a preservação ambiental.

Ao longo do século XX os objetivos do tratamento de esgoto foram sendo alterados. Se entre os anos de 1900 e 1970 os objetivos nos países desenvolvidos eram a remoção de sólidos suspensos, o tratamento de orgânicos biodegradáveis e a eliminação de organismos patogênicos, a partir dos anos 1980 os objetivos do tratamento foram expandidos, com a inclusão da remoção de constituintes que poderiam causar efeitos de longo prazo sobre

a saúde e impactos ambientais (METCALF & EDDY, 2016). Nas últimas décadas, os micropoluentes ambientais vêm sendo constantemente detectados em concentrações muito baixas nas águas superficiais, na ordem de grandeza de nanogramas (ppt), ou microgramas por litro (ppb) (BILA & DEZOTTI, 2007). Esta categoria de poluentes é bastante ampla e abriga compostos naturais, produtos farmacêuticos, passando por surfactantes, herbicidas, plastificantes e produtos de cuidados pessoais (AVILA *et al.*, 2014). Mesmo com essa mudança de paradigma, observa-se que as estações de tratamento de esgoto (ETE) atuais, em sua imensa maioria, não foram concebidas para remoção de micropoluentes, o que faz com que muitos destes compostos permaneçam no efluente destas ETEs, tanto pela sua persistência e continua introdução, como pela falta de mecanismos para tratar, remover e monitorar tais substâncias (BOLONG *et al.*, 2009).

Micropoluentes orgânicos podem causar diversos impactos no ambiente e nas populações que estão expostas a eles, como a desregulação do sistema endócrino e reprodutivo de seres humanos e animais (BILA & DEZOTTI, 2003). Várias são as substâncias que possuem a capacidade de interferir no sistema endócrino, tais como, substâncias sintéticas (alquilfenóis, pesticidas, ftalatos, policlorados de bifenilas (PCD), bisfenol A, substâncias farmacêuticas, entre outras) e substâncias naturais (estrogênios naturais e fitoestrogênios) (BILA & DEZOTTI, 2007). Muitos desses compostos já tiveram comprovação de sua atividade como desreguladores endócrinos (SALOMÃO & MARQUES, 2015). Dentre estes, podemos citar o 17 α Etinilestradiol (EE2) (XUE *et al.*, 2018). Verifica-se na literatura que, mesmo quando submetido a processos convencionais de tratamento de esgoto, o efluente ainda apresenta contaminação por este hormônio, levando a introdução contínua do EE2 no ambiente (SALOMÃO & MARQUES, 2015; FENT *et al.*, 2006).

A ficorremediação é definida como sendo a utilização de algas para remover e/ou biotransformar substâncias tóxicas (ou não), que podem causar danos ao meio ambiente (HANUMANTHA *et al.*, 2011). Algumas espécies de microalgas verdes unicelulares, tais como, *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus subspicatus*, e *Raphidocelis subcapitata* têm sido utilizadas (separadas ou em conjunto) em estudos de toxicidade, remoção e biodegradação de fármacos e outros compostos químicos, e até no tratamento de águas residuais (DANESHVAR *et al.*, 2018; MAES *et al.*, 2014). O tratamento de águas residuárias por processo de ficorremediação está atraindo o interesse por ser uma tecnologia de baixo custo (operacionais e infraestrutura), por ter uma alta capacidade de remoção de nutrientes e altas taxas de produção de biomassa, com potencial aplicação para produção de biocombustíveis (DANESHVAR *et al.*, 2018).

OBJETIVO

Investigar o potencial de biorremoção do hormônio 17 α etinilestradiol utilizando-se neste processo a microalga unicelular *Chlorella vulgaris*, visando avaliar a possível redução da atividade estrogênica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Manutenção e cultivo de *Chlorella vulgaris*

A espécie de microalga unicelular fotossintética *Chlorella vulgaris* foi cultivada e mantida em incubadoras com fotoperíodo e temperatura controlada, de acordo com a Norma ABNT NBR 12648 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2011). Essa espécie de microalga foi adquirida do banco de algas da Universidade de Linnaeus, na Suécia. O cultivo foi replicado numa frequência mensal e o crescimento e desenvolvimento do cultivo foram acompanhados quinzenalmente por contagem em microscópio, medição da clorofila *in vivo* por fluorescência (485 nm de excitação e 685 nm de emissão) e mensalmente por carta controle, segundo a mesma norma ABNT NBR 12648 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2011).

Compostos de interesse

Os solventes utilizados no preparo das soluções estoques foram de grau HPLC (Tedia, Fairfield, EUA). Os padrões cromatográficos e os reagentes usados no ensaio da atividade estrogênica YES foram adquiridos na Sigma-Aldrich. A água ultrapura foi obtida no sistema Milli-Q Plus system da Millipore (USA) com 18,2 M Ω cm de resistividade. O micropoluento selecionado foi 17 α ethinylestradiol (EE2) (CAS 5763-6).

Bioensaios de remoção e biotransformação de EE2 com *C. vulgaris*

Os bioensaios tomaram como base a Norma ABNT NBR 12648 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2011). Este método, estático, consistiu na exposição da microalga ao EE2 (50 μ g/L), durante um

período de 168h. O efeito tóxico foi determinado pela inibição do crescimento da biomassa de alga, quando comparado ao controle negativo. A biomassa inicial foi de $4,7 \times 10^7$ células/mL, mantida a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante 168 h, com fotoperíodo 16 h de claro e 8 h de escuro. As coletas para determinação da biomassa, composto livre em água, e a determinação da atividade estrogênica (ensaio YES) foram realizadas nos seguintes intervalos: 0; 24; 48; 72; 144 e 168 h.

A determinação da biomassa de alga foi efetuada de duas maneiras. Através de contagem celular em microscópio óptico, em câmara de Neubauer, com a preservação de 1 mL das amostras de algas em solução de lugol, sendo os resultados analisados no programa estatístico GraphPad Prism v.5.0. A outra forma utilizada foi através de filtração em membrana com pesagem do material retido após secagem em estufa a 60°C durante 1 h (ou até que fosse atingido peso constante em 2 pesagens consecutivas).

Análise cromatográfica

A determinação da concentração do EE2 livre em água foi realizada com a centrifugação da solução de microalga (2000 rpm por 15 min a 4°C), seguido de extração de 100 ml do sobrenadante em SPE e analisado no UPLC.

As amostras foram extraídas em SPE em cartucho BondElut® C18. O condicionamento do cartucho foi à vácuo com fluxo de aprox. 3 mL/min e com os seguintes solventes: hexano; acetona; metanol; água ultrapura em pH 3. Em seguida, 100 mL das amostras (em pH 3) foram percolados com fluxo de 3 mL/min. Após a extração, os cartuchos foram secos à vácuo e armazenados em freezer (-20°C). A eluição foi realizada com 4 mL de metanol e a filtração em filtro de seringa de 0,22 µm.

O EE2 foi identificado e quantificado por cromatografia em fase líquida de ultra eficiência, sistema Waters ACQUITY®, acoplado ao espectrômetro de massas tipo in tandem, Xevo TQD®, triplo quadrupolo (UPLC-MS/MS Waters). A coluna utilizada foi a AQUITY UPLC® BEH C18, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm (Waters) a 50°C , com fluxo de 0,4 mL/min e com as fases móveis A=água e B=metanol, ambas com 0,01% hidróxido de amônio. O volume de injeção foi de 5 µL e o tempo de corrida de 8 min, em modo gradiente, com condição inicial de 90% da fase A até 4 min., em seguida, sendo reduzida para 1% desta fase até 5 min., e finalmente retornando e mantendo-se no estado inicial até o final da corrida. O detector de massas com fonte de electrospray (ESI) foi operado em modo negativo com monitoramento de reações múltiplas (MRM). A voltagem capilar foi de 3,2kV. A temperatura da fonte e de dessolvatação foram de 150°C e 600°C , respectivamente. N₂ foi usado como gás de cone e de dessolvatação (150 e 1100 L/h, respectivamente). O Argônio foi usado como gás de colisão no detector MS/MS (0,15 mL/min).

Uma curva de calibração para o composto EE2 foi preparada e os dados referentes à área foram transformados em valores de concentração através de regressão linear utilizando o programa R. Os dados obtidos foram corrigidos para o fator de recuperação observado no ensaio (FR = 95,3%).

Avaliação da atividade Estrogênica - Ensaio YES

A avaliação da atividade estrogênica foi realizada a partir do ensaio *Yeast Estrogen Screen* (YES) com cepas recombinantes (modificadas geneticamente) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* segundo protocolo estabelecido por ROUTLEDGE e SUMPTER (1996). Os ensaios, em capela de fluxo laminar, foram realizados com o precipitado da cepa descongelada, em um tubo T (tubo 1) com 10 mL de meio cultivo e agitados (agitação orbital) em 100 rpm/24 h, a 28°C . Em um novo tubo T (tubo 2) foram adicionados 10 mL de meio cultivo + 100 µL de solução do tubo 1. O tubo 2 foi incubado nas mesmas condições anteriores do tubo 1 (agitação orbital de 100 rpm por 24 h, a 28°C). Duas placas de 96 poços foram usadas para diluição e leitura do ensaio.

Na PLACA 1 (placa de diluição) foi preparada: uma curva de calibração do 17β estradiol (E2) com 12 pontos de concentrações com diluições sucessivas fator 2 (2724 a 1,3301 ng/L, em duplicata, linhas A e C); controle negativo (linhas B e D); e amostras a serem analisadas com 12 poços com concentração em diluições sucessivas fator 2. Na PLACA 2 (placa de ensaio), foram transferidos 10 µL de cada poço (PLACA 1) e adicionados 200 µL do meio análise (meio cultivo/CPRG/tubo 1). A PLACA 2 foi agitada por 2 min e incubada por 72 h a 30°C . Após 72 h, a PLACA 2 foi retirada da incubadora e após 1 h (em temperatura ambiente) foi lida a absorbância nos comprimentos de onda 540 nm e 620 nm, SPECTRAMAX M3 plate reader (Molecular Devices). O resultado de absorbância obtido para cada poço foi utilizado para calcular a concentração que causou efeito a 50% dos organismos ou Concentração Efetiva 50% (CE50), Citotoxicidade e o Equivalente Estradiol (EQ-E2)

de cada amostra, utilizando o Programa Origin (versão 8.0). Os cálculos foram realizados seguindo metodologia proposta por DO NASCIMENTO *et al.* (2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de biomassa no bioensaio de tratabilidade

Ao longo das 168 h de duração do ensaio, a produção total de biomassa (mg/L) no controle foi de 614,7 mg/L, correspondendo a um aumento de 174% em relação à biomassa inicial (crescimento diário de 13-33% ou 54-199 mg/L). No bioensaio com EE2 a produção de biomassa foi de 636,7 mg/L com um aumento de 185% (crescimento diário de 17-39% ou 74-236 mg/L) (Figura 1A). Não houve diferença significativa entre a produção de biomassa no controle e na presença de EE2 ($p>0,05$) durante 168 h, o que indica ausência de efeito tóxico crônico do EE2 sobre as microalgas. O tempo entre 0 h e 168 h foi significativo em relação à produção de biomassa nos bioensaios. Esses resultados foram importantes, visto que uma possível inibição de crescimento e redução de biomassa das microalgas, quando expostas ao EE2, poderia comprometer a eficiência de tratamento nos tanques quando em escala real.

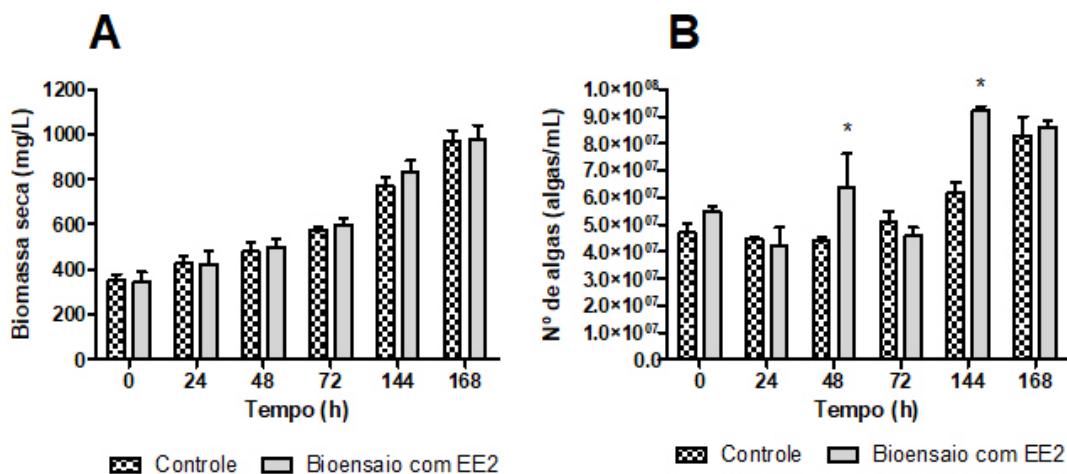


Figura 1: Produção de biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* durante as 168 h do bioensaio com o hormônio 17 α etinilestradiol (EE2) e o controle negativo: (A) avaliação da produção de biomassa seca (mg/L) a cada 24 h; (B) avaliação no número de microalgas (algas/mL) a partir da contagem em câmara de Neubauer. Diferença significativa ($p<0,05$) foi verificada nas amostras identificadas com *.

Em relação ao número de algas/mL, no tempo inicial 0 h e no tempo final, após 168 h, não foi verificada diferença significativa entre o controle e o bioensaio com EE2. No entanto, ao analisar os dados com o teste estatístico *two-way Anova* foi verificada uma diferença significativa no número de algas/mL em relação ao tempo de exposição ao EE2 ($p<0,0001$) e entre os bioensaios ($p = 0,002$). Tal fato provavelmente está associado às diferenças significativas observadas no bioensaio com EE2 nos tempos 48 h e 144 h onde foram verificados aumentos significativos no número de algas/mL (Figura 1B). Os resultados demonstram que durante o período de avaliação, mesmo apresentando oscilações no número de algas/mL, após o período de 168 h o número de algas não apresentou diferença em relação ao controle, reforçando a ausência de efeito tóxico crônico do hormônio sintético EE2 na concentração de 50 μ g/L na microalga *C. vulgaris* na densidade de 10^7 algas/mL, garantindo assim o não comprometimento do tratamento por um eventual efeito tóxico crônico de inibição de crescimento.

Ficorremediação na redução da concentração do EE2

A eficiência ou participação da *C. vulgaris* no tratamento para redução da concentração do EE2 (degradação) em relação aos outros processos de degradação, tais como a fotodegradação, foi significativa durante as 168 h ($p<0,01$) assim como a cada período de avaliação ($p<0,01$) (Figura 2). Os dados da Tabela 1 também corroboram com essa interpretação.

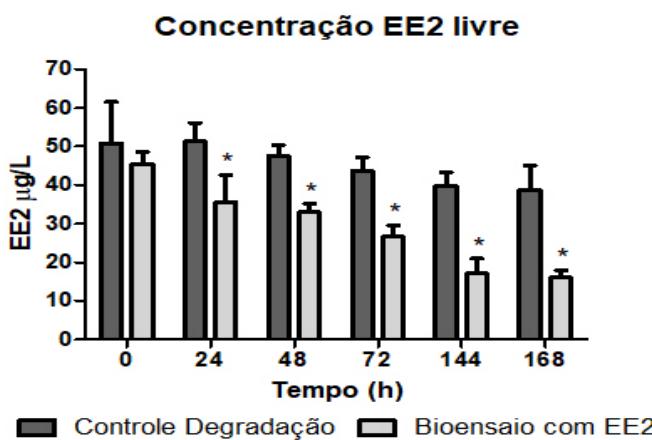


Figura 2: Avaliação dos processos de degradação do hormônio 17 α etinilestradiol (EE2) com e sem a presença das microalgas *C. vulgaris* durante o período de 168h. A diferença significativa ($p<0,05$) foi verificada nas amostras identificadas com *.

O ensaio com as microalgas apresentou uma redução total de 29,5 $\mu\text{g}/\text{L}$ (65% da concentração inicial de EE2), enquanto na ausência das microalgas o conjunto de processos denominado de degradação natural foi responsável por reduzir 12 $\mu\text{g}/\text{L}$ (24% da concentração inicial de EE2). A maior redução na concentração do EE2 foi verificada nas primeiras 24 h no bioensaio com microalgas, sendo esta de 9,9 $\mu\text{g}/\text{L}$ (22%); neste mesmo período das 24 h iniciais não foi observada redução no controle. Cabe ressaltar que a redução de 36% ou 9,5 $\mu\text{g}/\text{L}$ foi observada num período de 3 dias entre 72-144 h de exposição. Outro fator relevante é que geralmente as concentrações encontradas nos efluentes no Brasil são na faixa de <0,02–5,2 $\mu\text{g}/\text{L}$ (AQUINO *et al.*, 2013) e inferiores a concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ utilizada no presente trabalho. Sendo esta também inferior a concentração degradada na presença das microalgas nas primeiras 24 h do bioensaio (9,9 $\mu\text{g}/\text{L}$). Contudo, ainda cabe ressaltar que segundo QUARESMA *et al.* (2018) os efluentes brutos condomoniais no Brasil podem apresentar concentrações médias de até 86 $\mu\text{g}/\text{L}$ de EE2.

Tabela 1: Redução da concentração do hormônio 17 α etinilestradiol (EE2) por processos de degradação na presença ou ausência das microalgas *C. vulgaris* durante o período de 168 h.

	24 h	48 h	72 h	144 h*	168 h	Total
Bioensaio com EE2	9,9 (22%)	2,7 (8%)	6,4 (19%)	9,5 (36%)	1,1 (6%)	29,5 (65%)
Controle degradação	0,0 (0%)	3,7 (7%)	4,1 (9%)	3,8 (9%)	0,9 (2%)	12,0 (24%)

* redução da concentração do EE2 $\mu\text{g}/\text{L}$ equivalente ao período de 3 dias entre 72-144 h (96, 120 e 144 h).

Densidade de microalgas na redução da concentração do EE2

A densidade de 10^7 algas/mL (ou 10^{10} algas/L) utilizada para a realização dos bioensaios de tratabilidade foi fundamental para que o efeito de toxicidade não fosse observado, uma vez que concentrações em ppt (ng/L) são capazes de causar efeito de toxicidade crônica de inibição de crescimento em microalgas em densidades de 10^4 algas/mL (SALOMÃO *et al.*, 2014). Segundo a literatura, alguns compostos orgânicos como 17 α -ethinylestradiol, levofloxacina, e carbamazepina podem ser usados como fonte de carbono, necessários para o crescimento de algumas espécies de microalgas mixotróficas, como o caso da *C. vulgaris*, e com isso, podem não apresentar efeito de inibição do crescimento, interferindo nos resultados dos ensaios (MAES *et al.*, 2014; XIONG *et al.*, 2017).

Ao avaliar o efeito da densidade de algas na redução da concentração do EE2 durante o período de tratamento, observa-se que houve um aumento na densidade de algas e uma consequente redução na concentração do EE2 (Figura 3). Para fazer esta análise, foi considerado o número de algas/mL inicial de cada período e a redução do EE2 no tempo subsequente (Tabela 2). A densidade de 10^7 algas/mL foi mais eficiente na redução da concentração do EE2 nas primeiras 24h pela *C. vulgaris*. Em um estudo realizado por MAES *et al.* (2014) com *Desmodesmus subspicatus* na densidade de 10^6 algas/mL também foi constatada uma maior taxa de redução (23%) da concentração inicial (20 $\mu\text{g}/\text{L}$) de EE2 nas primeiras 24h. Já segundo HOM-DIAZ *et al.*, (2015), as

espécies de microalga *Selenastrum capricornutum* e *Chlamydomonas reinhardtii* foram capazes de reduzir o EE2 por biodegradação em 46% e 41% em um período de 7 dias (168 h).

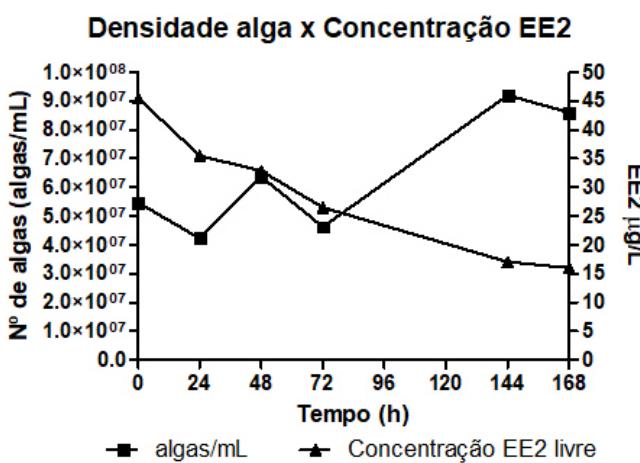


Figura 3: Relação da densidade da microalga *C. vulgaris* e com a redução da concentração do hormônio 17 α etinilestradiol (EE2) durante o período de 168 h.

A compreensão dos resultados de redução da concentração do EE2 pelo tempo de exposição das microalgas pode possibilitar uma melhor eficiência de remoção dos micropoluentes, sendo o tempo de exposição, o tempo de retenção hidráulica necessário em tanques de alga com altas densidades a ser aplicado como tratamento terciário em sistemas descentralizados de tratamento de esgoto domésticos.

Tabela 2: Comparaçao entre a densidade da microalga *C. vulgaris* e a redução da concentração do hormônio 17 α etinilestradiol (EE2) durante o período de 168 h.

	0-24 h	24-48 h	48-72 h	72-144 h*	144-168 h
Densidade (alga/mL)	5.47E+07	4.23E+07	6.37E+07	4.63E+07	9.20E+07
Redução do EE2 (µg/L)	9.9	6.8	4.6	11 (3.7*)	1.9

* Redução do EE2 µg/L proporcional a cada 24 h no período entre 72-144 h (96, 120 e 144 h).

Atividade estrogênica

Após as 168 h foi constatada uma alta atividade estrogênica, fato já esperado devido à alta concentração inicial de EE2 no bioensaio (50 µg/L) e a eficiência de tratamento ter sido de 65% com uma concentração final de 16 µg/L. Contudo, nas primeiras 24 h, onde foi verificada a maior taxa redução da concentração diária, foi verificada uma redução de 42% na atividade estrogênica. Nos outros períodos de monitoramento a atividade estrogênica apresentou grandes oscilações o que pode indicar a contribuição microalga *C. vulgaris* na biotransformação do EE2 em outros compostos (metabólitos) com diferentes potenciais de atividade estrogênica. Para um maior esclarecimento da atividade destes metabólitos será necessário o monitoramento dos metabólitos para uma melhor avaliação da atividade estrogênica resultante.

Poucos estudos foram registrados sobre o potencial de microalgas na degradação e/ou remoção de hormônios. A espécie de microalga *Desmodesmus subspicatus* foi capaz de remover, em testes de bancada, quase 70% do hormônio EE2 num período de 72 h, partindo de uma concentração de 20 µg/L (MAES *et al.*, 2014). O mesmo estudo mostrou ainda que a alga biotransformou o hormônio testado, no entanto não foi verificado se houve redução da atividade estrogênica após a biotransformação (MAES *et al.*, 2014). Desta forma, a avaliação do potencial de remoção e biodegradação de hormônios por diferentes espécies de microalga pode ser considerada como uma estratégia atraente na busca por metodologias eficientes de tratamento biológico para a remoção/biodegradação dos compostos com atividade estrogênica presentes nos efluentes domésticos e municipais.

CONCLUSÕES

A *Chlorella vulgaris* mostrou-se muito promissora para a redução de elevada concentração inicial de hormônio EE2 (50 µg/L) em meio aquoso, apresentando apenas uma redução na população de indivíduos no início, o que não afetou o desempenho superior do ensaio com a microalga frente ao controle, com remoção média do hormônio EE2 de 29,48 µg/L, representando 64,8% do total, frente a 11,98 µg/L (23,6%) observados na amostra controle. A elevada densidade de algas (10^7 algas/mL) pode ser apontada como fator determinante para este desempenho.

Durante as primeiras 24 h a microalga *Chlorella vulgaris* e os processos de biodegradação a ela associados foram responsáveis por uma grande redução na concentração do EE2 (9,9 µg/L) enquanto o controle não apresentou qualquer redução. Esta redução da concentração também foi acompanhada de uma diminuição de 42% na atividade estrogênica.

Como próximos passos estão previstas a detecção e a quantificação dos compostos gerados após o tratamento do EE2 pela *C. vulgaris*, bem como a realização do mesmo bioensaio com concentração inicial menor de EE2, com valores de partida entre 1,0 e 5,0 µg/L para verificação de possível remoção da atividade estrogênica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro da FAPERJ (Proc. E-26/201.298/2016) e do CNPq (Proc. 308335/2017-1); projeto CNPq (Proc. 436327/2018-0); Bolsa PROATEC-UERJ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae) - NBR 12648. Rio de Janeiro, Brasil: [s.n.], 2011.
2. AQUINO, S.; BRANDT, E.; CHERNICHARO, A. Removal of pharmaceuticals and endocrine disrupters in sewage treatment plants: literature review Remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto : revisão da literatura. Engenharia Sanitária e Ambiental, v. 18, p. 187–204, 2013.
3. AVILA, C. MATAMOROS, V., REYES-CONTRERAS, C., PIÑA, B., CASADO, M., MITA, L., BAYONA, J. M.. Attenuation of emerging organic contaminants in a hybrid constructed wetland system under different hydraulic loading rates and their associated toxicological effects in wastewater. Science of the total environment, v. 470, p. 1272-1280, 2014.
4. BILA, D. M., DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. Química Nova, v. 26, n. 4, p. 523-530, 2003.
5. BILA, D.M., DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. Química nova, v. 30, n. 3, p. 651, 2007.
6. BOLONG, N., ISMAIL, A. F., SALIM, M. R., & MATSUURA, T. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. Desalination, v. 239, n. 1-3, p. 229-246, 2009.
7. DANESHVAR, E., ANTIKAINEN, L., KOUTRA, E., KORNAROS, M., & BHATNAGAR, A.. Investigation on the feasibility of *Chlorella vulgaris* cultivation in a mixture of pulp and aquaculture effluents: Treatment of wastewater and lipid extraction. Bioresource technology, v. 255, p. 104-110, 2018.
8. DO NASCIMENTO, M. T. L. et al. Determination of water quality, toxicity and estrogenic activity in a nearshore marine environment in Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 149, n. December, p. 197–202, 2018.
9. FENT, K.; WESTON, A. A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands), v. 76, n. 2, p. 122–159, 2006.
10. HANUMANTHA, R, P, et al. Application of phytoremediation technology in the treatment of wastewater from a leather-processing chemical manufacturing facility. Water SA v.37 n.1, p. 7–14, 2011.
11. HOM-DIAZ, A., et al. 2015. Microalgae cultivation on wastewater digestate: beta-estradiol and 17 alpha-ethynylestradiol degradation and transformation products identification. Journal of Environmental Management, 155, 106-113.
12. MAES, H.M. et al. Uptake, elimination, and biotransformation of 17 α -ethynylestradiol by the freshwater alga *Desmodesmus subspicatus*. Environmental science & technology, v. 48, n. 20, p. 12354-12361, 2014.
13. METCALF, Leonard; EDDY, Harrison P. Tratamento de efluentes e recuperação de recursos. McGraw Hill Brasil, 2016.

14. QUARESMA, A. DE V. et al. Ocorrência de fármacos e desreguladores endócrinos em esgoto bruto e tratado na cidade de Belo Horizonte (MG). *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 23, n. 6, p. 1199–1211, 2018.
15. ROUTLEDGE, Edwin J.; SUMPTER, John P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 15, n. 3, p. 241-248, 1996.
16. SALOMÃO, A.L.S.; MARQUES, M. Estrogenicity and genotoxicity detection in different contaminated waters. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, v. 21, n. 7, p. 1793-1809, 2015.
17. SALOMÃO, André Luís et al. Effects of Single and Mixed Estrogens on Single and Combined Cultures of *D. subspicatus* and *P. subcapitata*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, v. 93, n. 2, p. 215-221, 2014.
18. SNIS Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos 2017. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento, Ministério do Desenvolvimento Regional. Disponível em: <<http://www.snis.gov.br/diagnostico-agua-e-esgotos/diagnostico-ae-2017>> Acesso em: 15/03/2019
19. XIONG, Jiu-Qiang et al. Ciprofloxacin toxicity and its co-metabolic removal by a freshwater microalga *Chlamydomonas mexicana*. *Journal of hazardous materials*, v. 323, p. 212-219, 2017.
20. XUE, W., XIAO, K., LIANG, P., & HUANG, X. Roles of membrane and organic fouling layers on the removal of endocrine disrupting chemicals in microfiltration. *Journal of Environmental Sciences*, 2018